Aus der Abteilung Allgemeine Chirurgie
und Unfallchirurgie mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Koslowski
der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen

Wirkung eines standardisierten Verbrennungstraumas und niedermolekularer Fraktionen verbrannter Haut auf die RNA-Synthese der isoliert perfundierten Rattenleber

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
JÜRGEN SOMMERFELD
aus Ludwigsburg

1984

Aus der Abteilung Allgemeine Chirurgie
und Unfallchirurgie mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Koslowski
der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen

Wirkung eines standardisierten Verbrennungstraumas und niedermolekularer Fraktionen verbrannter Haut auf die RNA-Synthese der isoliert perfundierten Rattenleber

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
JÜRGEN SOMMERFELD
aus Ludwigsburg

1984

Dekan:	Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Dr. K. H. Schmidt
2. Berichterstatter:	Professor Dr. L. Koslowski

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Autotoxische Prozesse bei der Verbrennungskrankheit - eine Beschreibung des Basler Verbrennungstoxins	1
1.2.	Wahl der Testsysteme	3
1.3.	Wahl der untersuchten Stoffwechselleistung	4
1.3.1.	Grundsätzliches zur RNA-Synthese	6
2.	MATERIAL UND METHODIK	9
2.1.	Materialien	9
2.2.	Methodik	9
2.2.1.	Verbrennung	9
2.2.1.1.	Präparation	11
2.2.2.	Isolation niedermolekularer Substanzen aus dem Serum verbrannter Ratten	12
2.2.2.1.	Serumgewinnung	12
2.2.2.2.	Ultrafiltration des Serums	13
2.2.3.	Herstellung der Dialysate	13
2.2.4.	Perfusion der gesamten Leber	14
2.2.4.1.	Perfusionsmedium	14
2.2.4.2.	Operationstechnik	14
2.2.4.3.	Perfusions-Apparatur	16
2.2.5.	Aufbereitung	17
2.2.6.	Anmerkungen zur Schwerkraftperfusion	18
2.2.7.	Hepatocytenisolierung	19
2.2.7.1.	Vorperfusion	19
2.2.7.2.	Perfusion mit Collagenase	20
2.2.7.3.	Prüfung der Vitalität	21
2.2.8.	Inkubation	22
2.2.8.1.	Bestimmung physiologischer Mengenverhältnisse zur Inkubation	22

Seite

2.2.8.2. Messung der RNA-Synthese 22

2.2.9. Statistik 23

3. ERGEBNISSE 24

3.1. Wirkung niedermolekularer Fraktionen verbrannter Haut auf die RNA-Synthese der perfundierten Rattenleber 24

3.2. Wirkung standardisierter Verbrennungen auf die RNA-Synthese der perfundierten Rattenleber 27

3.3. Inkubation isolierter Hepatocyten mit niedermolekularen Fraktionen, gewonnen aus Seren verbrannter Tiere 29

3.4. Inkubation isolierter Hepatocyten mit Seren verbrannter Tiere 31

3.5. Letalität 31

3.6. Lebergewicht und Flow nach Verbrennung bzw. Zugabe niedermolekularer Fraktionen aus verbrannter Haut zum Perfusionsmedium - Beobachtungen 33

4. DISKUSSION 35

4.1. Verbrennungsprodukte der Haut - Wirkungen und mögliche Angriffspunkte 36

4.2. Nach Verbrennungstrauma beobachtete Stoffwechselveränderungen - mögliche Ursachen und Zusammenhänge 40

5. ZUSAMMENFASSUNG 45

6. LITERATURVERZEICHNIS 47

Liste der verwandten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclo-AMP
Ci	Curie
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinacid
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
MG	Molekulargewicht
mM	milliMol
mRNA	messenger-RNA
n. V.	nach Verbrennung
o. g.	oben genannt
rel.	relativ
PP	Pyrophosphat
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
TCA	Trichloracid
Tg	Tag
rpm	rounds per minute
tRNA	transfer-RNA
VT	Verbrennungstoxin

1. EINLEITUNG

Nachdem es heute meist gelingt, Schock und Frühinfektion nach Verbrennungen erfolgreich zu therapieren, kommt es nach ca. 1 Woche häufig zu Komplikationen in Form einer nicht beherrschbaren Sepsis. Sie führt bei einem sehr hohen Prozentsatz der Patienten zum Tode.

Auffällig bei dieser sogenannten Spätsepsis ist, daß Bakterien am Werk sind, die dem menschlichen Organismus normalerweise kaum gefährlich werden. So muß festgestellt werden, daß das einzige, was man in den letzten Jahrzehnten erreichen konnte, ein Hinauszögern des Todeszeitpunktes war.

Die Suche nach neuen Therapieformen führte zu der Hypothese, daß die Verbrennungskrankheit durch eine oder mehrere autotoxische Substanzen hervorgerufen wird, die durch Hitzeeinwirkung in der Haut entstehen.

1975 (76) gab Schoenenberger an, das Verbrennungstoxin - in der Literatur als Basler Verbrennungstoxin bekannt - isoliert zu haben. Bald darauf (Wuest/Schoenenberger 1977) wurde auch der entsprechende Antikörper beschrieben.

1.1. Autotoxische Prozesse bei der Verbrennungskrankheit - eine Beschreibung des Basler Verbrennungstoxins

Isolierung

Menschliche Spalthaut wurde bei 250°C ca. 20 sec. verbrannt. Nach Homogenisierung, einer Ammoniumsulfat- und Acetonfällung erhielt man in bis zu 6 %iger Ausbeute ein Zwischenprodukt, das sich in 4-stufiger Sucrosedichtegradientenzentrifugation in 2 Banden (Dichte: Bande I 1,25 / Bande II 1,31) spalten ließ. Eine identische Aufbereitung

unverbrannter Hauthomogenisate ergab lediglich eine Bande (Dichte: 1,25).

Im nachfolgenden Toxizitätstest erwies sich die Bande mit der Dichte 1,31 als toxisch.

Bei analoger Aufbereitung rasierter Mäusehaut erhielt man ebenfalls 2 Banden, von denen 1 toxisch, die andere mit der unverbrannter Haut identisch war.

Das Material aus Bande I und Bande II wurde analytisch aufgearbeitet und man entwickelte folgende

Modellvorstellung

Nach Einwirkung thermischer Energie entsteht das Verbrennungstoxin in der Haut (MG 3 x 10^6) durch Trimerisierung einer nativen Vorstufe (MG 1 x 10^6).

Dabei handelt es sich beim Verbrennungstoxin nach Schoenenberger um einen makromolekularen Lipid-Protein-Komplex, bei dem ein Apoproteinkern von einer dichten Lipidhülle umgeben wird.

Die Resorption aus verbrannter Haut erfolgt langsam (7-10 Tage). Befindet sich das Verbrennungstoxin jedoch einmal im Blut, entfaltet es seine letal toxische Wirkung auf die Rezeptorzellen. Als Angriffspunkt dient die Zellmembran.

Deutliche Veränderungen wurden in der Struktur der Mitochondrien gefunden (Vacuolisation und Cristolyse).

Erfolgte die Untersuchung am 5. Tag nach der Vorbehandlung mit Verbrennungstoxin, so konnten an der perfundierten Leber und an isolierten Hepatocyten Stoffwechselveränderungen nachgewiesen werden.

Bei Gabe von Antitoxin fanden sich die beobachteten Veränderungen nicht.

Versuche, die die geschilderten Wirkungen reproduzieren sollten (16), ergaben, daß Dialysate verbrannter Haut die RNA-Synthese isolierter Hepatocyten erniedrigen.

Ziel dieser Arbeit war, die RNA-Synthese von Leberzellen nach standardisierter Verbrennung zu untersuchen.

Das in Vorversuchen angewandte Modell der isolierten Hepatocyten wurde hierzu verlassen, da anzunehmen war, daß die vorgeschädigten Zellen vorbehandelter Tiere die Isolationsprozedur von vorneherein nicht überleben würden.

Die Folge wäre, daß die Messungen nur an den absolut intakten Zellen durchgeführt würden, was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führte.

Zunächst mußte jedoch getestet werden, ob sich die mit Dialysat (niedermolekulare Fraktionen verbrannter Haut) an isolierten Hepatocyten gefundenen Effekte an der perfundierten Leber reproduzieren lassen.

Neben der Wirkung dieser niedermolekularen Fraktionen auf die RNA-Synthese wurden im Rahmen dieser Arbeit ferner niedermolekulare Substanzen getestet, die durch Ultrafiltration aus Seren verbrannter Tiere gewonnen worden waren.

1.2. Wahl der Testsysteme

Wie oben schon erwähnt, stehen zur Untersuchung des Leberstoffwechsels hauptsächlich zwei Methoden zur Verfügung. Zum einen die des Arbeitens mit isolierten Hepatocyten, zum anderen die der Perfusion der Leber.

Die Leberperfusion bietet den Vorteil, daß alle Membranen, Lymph- und Gefäßbahnen intakt bleiben und nicht durch das Isolationsverfahren traumatisiert werden. Organspezifische Regulationsphänomene (auf überzellulärer Ebene) bleiben erhalten. Geschädigte Zellen verbleiben im Zellverband und machen sich bei Stoffwechselmessungen bemerkbar, wodurch speziell Versuche mit vorbehandelten Tieren gut durchführbar sind.

Man kann deshalb davon ausgehen, daß die Methode der isoliert perfundierten Leber eine genauere und korrektere Aussage über den physiologischen Zustand ermöglicht (53,16).

Stehen nur geringe Mengen der zu untersuchenden Substanz zur Verfügung, bietet die Hepatocytenisolierung die Möglichkeit, einige wenige Zellen mit dem interessierenden Stoff in entsprechender Konzentration zu inkubieren. Zudem wird es durch die große Zahl Hepatozyten, die pro Arbeitsgang aus einer Leber isoliert werden können, möglich, mehrere Tests parallel ablaufen zu lassen.

Dadurch ist einerseits ein Vergleichen und Abwägen der einzelnen Inkubationsansätze möglich, andererseits ist gewährleistet, daß mit einer einheitlichen Zellpopulation gearbeitet wird und die Ergebnisse stets durch direkte Kontrollen relativiert werden können. Im Gegensatz dazu sind bei der Verwendung der perfundierten Leber größere Versuchskollektive nötig, um zu abgesicherten Ergebnissen zu gelangen.

Beide Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit angewandt.

An isolierten Hepatocyten wurden die durch Ultrafiltration aus Seren verbrannter Tiere gewonnenen Substanzen getestet, die übrigen Untersuchungen wurden an der isoliert perfundierten Leber durchgeführt.

1.3. Wahl der untersuchten Stoffwechselleistung

Nach Verbrennungen kommt es zu einer Beeinträchtigung des fein abgestimmten Gleichgewichts der Körperfunktionen mit einem Überwiegen der katabolen Effekte. Dies äußert sich u.a. in einer drastischen Reduktion des Serumproteinspiegels.

Darüberhinaus finden sich starke Verschiebungen im Energiehaushalt; erkennbar an einer deutlichen Senkung des Energiequotienten ATP/AMP (43).

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Materialien

- Ratten 220-300 g / ♂ / Wistar: Tierzuchtanstalt Ivanovas/Kisslegg
- NMRI Mäuse 25 g / ♀: Tierfarm Sulzfeld
- Nembutal® (Pentobarbital Natrium) 60 mg/ml: ABBOTT Belgien
- Heparin-Natrium 25000 medac (5000 IE/ml): medac Hamburg
- gebräuchliche Laborchemikalien: Merck, Darmstadt
- ^{14}C-Uridin 465 mCi/mmol mit einer radioaktiven Konzentration von 50 Ci/ml: Amersham-Buchler, Braunschweig
- Quickszint 501 (Fluoreszenz Maximum bei 430 nm): Zinsser, Frankfurt/Main
- Whatman Glass Microfibre Filters 2,5 cm /GF/F)
- Penicillin/Streptomycin (10 000 E bzw. 10 000 g/ml): Serva, Heidelberg
- Visking Dialysierschläuche: Serva, Heidelberg
- Ultrafiltrationsgerät: Berghof GmbH, Membranfiltertechnik, Tübingen
- Diaflo Ultrafilter PM 30: Amicon GmbH, Witten/Ruhr

2.2. Methodik

2.2.1. Verbrennung

Erfolgte mit einer Apparatur (s. Abb. 1), die es ermöglicht, die Parameter Temperatur/Druck/Zeit/verbrannte Fläche

- beliebig zu wählen
- absolut konstant zu halten
- identisch zu reproduzieren.

1.3.1. Grundsätzliches zur RNA-Synthese

Die Tatsache, daß das RNA-Molekül eine lange, unverzweigte Kette darstellt, die vier verschiedene Nukleotide verwendet, legt den Gedanken nahe, daß die genetische Information der DNA auf eine komplementäre Sequenz von RNA-Nukleotiden übertragen wird.

Voraussetzung hierfür ist, daß sich die DNA-Stränge zu bestimmten Stadien des Zellzyklus trennen und der kodogene Strang als Matrize für den neu zu bildenden Strang fungiert.

Diesen Synthesevorgang nennt man Transkription; die katalysierenden Enzyme RNA-Polymerasen.

Die Ribonucleotide der RNA sind gegenüber den Desoxyribonucleotiden durch zwei chemische Strukturmerkmale gekennzeichnet. Sie enthalten als Zuckerbestandteil Ribose (statt Desoxiribose) und statt Thymin die Pyrimidinbase Uracil (vgl. Versuchsansatz: Anbieten von radioaktiv markiertem ^{14}C Uridin).

Ganz allgemein werden an der DNA drei Arten von RNA synthetisiert:

- transfer RNA — Übertragung von Aminosäuren zum Proteinsyntheseapparat der Zelle, wobei jede Aminosäure an eine für sie spezifische t-RNA angeheftet wird.
- ribosomale RNA — bildet zusammen mit Proteinen (≙ 1/3 der Masse) die Ribosomen. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten (40S/60S), die die universelle Druckmaschine der Proteinsynthese darstellen.
- messenger RNA — überbringt dem Proteinsyntheseapparat eine Abschrift des Gens (sog. Matrize).

In eukaryontischen Zellen finden sich drei verschiedene RNA-Polymerasen (A/B/C bzw. I/II/III). Sie sind wie die bakteriellen Polymerasen aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt und unterscheiden sich untereinander in ihrem Transkriptionsprogramm. Alle sorgen jedoch dafür, daß die Nucleotide an das 3' OH Ende einer wachsenden Kette

angeheftet werden, wobei das Pyrophosphat des eingebauten Nukleotids freigesetzt wird.

Experimentell von großer Bedeutung ist die Hemmbarkeit der RNA-Polymerasen bei Eukaryonten durch α-Amanitin (ein Gift des Knollenblätterpilzes).

Eine Steuerung der RNA-Synthese ist neben einer Hemmung der RNA-Polymerase auch durch die Regulation der Genaktivität möglich.

Hier wird die erstmals 1961 von Jacob & Monod veröffentlichte Hypothese zur Regulation der Transkription bei Prokaryonten inzwischen als gesichert angesehen.

Nach ihr gliedern sich die Gene der DNA in drei Gruppen, in Regulator-, Operator- und Strukturgene, deren Beziehung streng hierarchisch gegliedert ist. Als Vermittler zwischen den räumlich getrennten Regulator- und Operatorgenen fungiert ein sogenannter Repressor. Entsprechende Genorte müssen bei Eukaryonten vorliegen (87,90).

Sollen bestimmte Strukturgene abgelesen werden, so wird der RNA-Polymerase eine Anlagerung an eine spezifische Stelle des vorgeschaltenen Operators, dem Promotor, ermöglicht und die Transkription kann beginnen.

Die Geschwindigkeit der RNA-Synthese liegt in vivo zwischen 20 und 50 Polymerisationsschritten in der Sekunde (bei 37°C). Dieser Wert gilt für alle drei RNA-Arten. Unterschiede zeigen sich jedoch hinsichtlich ihrer Lebensdauer (38).

Der Abbau typischer mRNA Moleküle beginnt in Bakterien meist schon nach 1-3 Minuten; die anderen RNA-Arten werden erst nach mehreren Zellgenerationen abgebaut. Offensichtlich ist die kurze Lebensdauer der mRNA jedoch ein wesentliches Element des Regulationsmechanismus. Nur so ist eine ständige Anpassung der Proteinsynthese an veränderte äußere Bedingungen möglich.

Die Synthese der RNA stellt damit einen extrem empfindlichen Parameter für den momentanen Zustand der Zelle, für die Aktivität und Unversehrtheit ihrer Organellen, dar (16). Setzt doch der Aufbau aus den angebotenen Nucleotiden z.B. radioaktiv markiertes ^{14}C-Uridin, das Zusammenwirken von Kern, Mitochondrien und Cytoplasma voraus, wobei die Gesamtsyntheseleistung durch das schwächste Glied der Kette bestimmt wird.

Um weitere Aufschlüsse über die Verbrennungskrankheit zu erhalten, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung eines standardisierten Verbrennungstraumas und niedermolekularer Fraktionen verbrannter Haut auf die RNA-Synthese der isoliert perfundierten Rattenleber untersucht werden.

Für den erniedrigten Plasmaproteingehalt werden in der Literatur (16,47,75) verschiedene Ursachen diskutiert.

- Permeabilitätsänderungen an den Gefäßwänden führen dazu, daß ein großer Teil der Serumproteine ins Gewebe abdiffundiert und auch in der Flüssigkeit von Blasen zu finden ist.
- Ein Freiwerden proteolytischer Enzyme aus nekrotischen Zellen.
- Eine erhöhte Proteinurie durch schockbedingte Epithelschäden.
- Eine reduzierte Syntheserate der Proteine in der Leber. Eine solche Reduktion konnte an isolierten Hepatozyten nicht nachgewiesen werden (16). Auch bei Untersuchung der isoliert perfundierten Leber sowie bei Messung am Ganztier konnte keine Beeinträchtigung der Serumproteinsyntheserate in der Leber gefunden werden.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei der Synthese der lebereigenen Proteine. Für sie wurde eine Hemmung der Syntheserate n.V. beschrieben (47).

Es muß folglich ein sehr spezifischer Effekt sein, der zu dieser Hemmung der Synthese von Leberproteinen führt. Eine Energiestoffwechselstörung reicht zur befriedigenden Erklärung dieser Phänomene allein nicht aus.

An zentraler Stelle der Proteinsynthese stehen die Ribonukleinsäuren. Eine Beeinflussung ihres Stoffwechsels wirkt sich direkt auf die Proteinsynthese aus und läßt Raum für spezifische Regulationsphänomene.

Der Einfluß eines standardisierten Verbrennungstraumas auf die RNA-Synthese ist demzufolge für die Klärung der Zusammenhänge von großem Interesse.

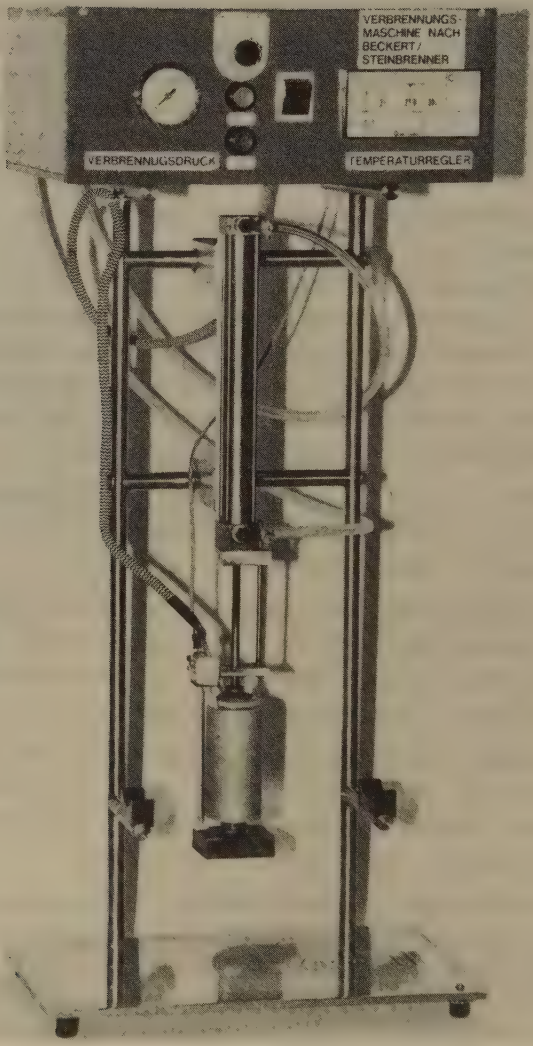

Abb. 1: Verbrennungsmaschine

Außerdem wurde eine Schädigung tiefer gelegener Gewebe und Organsysteme ausgeschlossen.

30 % der Körperoberfläche wurden mit 250°C bei einem Druck von 500 g/cm² 40 Sek. lang verbrannt. Entscheidendes Kriterium für die Verbrennungsdauer war das vollständige Verdampfen des Gewebswassers - erst dann ist die optimale Toxinbildung erfolgt (77). Eine längere Verbrennung würde zum Festkleben der verbrannten Haut führen und sie pergamentartig brüchig machen.

2.2.1.1. Präparation

Die als Versuchstiere benutzten männlichen Wistarratten erhielten Standardkost und Wasser ad libitum. Etwa 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde ihnen das Futter entzogen, das Wasser belassen.

Am rasierten Rücken der Ratten schneidet man am Nacken und am caudalen Ende durch die Haut und präpariert sie stumpf ab. Dabei wird die Mobilisation der gesamten Rückenhaut angestrebt. Erst so wird eine 30 %ige Verbrennung möglich.

Unter das Hautstück, das verbrannt werden soll, wird der Verbrennungsspatel vom Schwanzende her eingeführt und am Nacken ausgeleitet. Das jetzt am Verbrennungsspatel hängende Tier wird in die "Verbrennungsmaschine" eingebracht. Ein Ausreißen der Haut während der Verbrennung wird durch Unterstützen des Tieres vermieden. Die Gestaltung des Spatelquerschnitts sorgt für ausreichende Distanz der zu verbrennenden Haut vom darunterliegenden Gewebe. Außerdem wird eine Wärmeableitung ermöglicht; - kalte Luft wird mit einem Fön durch den kanalförmigen Querschnitt geblasen.

Der 250°C heiße Metallstempel mit einer Fläche von 20 cm² wird auf Knopfdruck hydraulisch gegen die zu verbrennende Haut gepreßt und hebt sich exakt nach der vorgewählten Zeit (40 Sek.) wieder ab. Während dieser Zeit muß man dafür

sorgen, daß die Haut am Stempelrand nicht festklebt; sonst wird sie mit dem sich hebenden Stempel abgerissen. Nacheinander werden so 4 der Stempelgröße entsprechende Flächen verbrannt.

Es empfiehlt sich, am cranialen und caudalen Ende der zu verbrennenden Haut einen schmalen Streifen (2-3 mm) unverbrannt zu lassen, da dann ein Ausreißen der Haut beim Wundverschluß mit Klammern vermieden werden kann.

Nach der Verbrennung zieht man den Spatel vorsichtig heraus, so daß das Tier auf das nicht erhitzte Spatelende zu liegen kommt. Ist die verbrannte Haut abgekühlt, wird der Spatel ganz herausgezogen; die caudalen und cranialen Schnitte werden mit Klammern geschlossen.

Zur Schockprophylaxe erhält das Tier 20 ml isotonischer NaCl i.p. Von nun an gibt man wieder Futter und Wasser nach Belieben.

2.2.2. Isolation niedermolekularer Substanzen aus dem Serum verbrannter Ratten

2.2.2.1. Serumgewinnung

Kontrollratten sowie standardisiert verbrannten Ratten (2 Tge n.V./5 Tge n.V.) wurde aus der Aorta 8-10 ml Blut entnommen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, eine Hämolyse zu vermeiden (großvolumige Kanüle/schnelles, aber behutsames Arbeiten).

Das Blut wurde gepoolt und 10 Min. bei 3000 rpm zentrifugiert, der Serumüberstand bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

2.2.2.2. Ultrafiltration des Serums

Das Serum der 3 zu untersuchenden Kollektive wurde jeweils in einem Berghof Ultrafiltrationsgerät unter ständigem Rühren bei 1,5 bar über einen Diaflo Ultrafilter PM 30 (amicon) gefiltert. Durch dieses Filter werden Substanzen mit einem Molekulargewicht > 30 000 ausgeschlossen. Der Vorlauf (10 % der gefilterten Menge) wurde verworfen.

2.2.3. Herstellung der Dialysate

100 weibliche NMRI-Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Nach einem zirculären Schnitt hinter den Vorder- und vor den Hinterbeinen wurde die Haut abgezogen, von subcutanem Fettgewebe gereinigt und auf einer mit Alufolie bezogenen Korkplatte ausgebreitet. Die Verbrennung erfolgte unter konstantem Druck mit einem auf 250°C erhitzten Metallstempel so lange, bis kein Wasserdampf mehr entwich.

In flüssigem N_2 aufbewahrt, wurden die Häute so spröde, daß sie sich leicht zu einem feinen Pulver mörsern ließen. Danach wurde das gewonnene Pulver in der dreifachen Menge Aqua bidest + 1 ml Penicillin/Streptomycin/l suspendiert und 10 Min. in einem Messerhomogenisator (Fa. Bühler, Tübingen) mit höchster Geschwindigkeit (10 000 rpm) unter H_2O-Kühlung homogenisiert.

Anschließend füllte man das Homogenisat in eingeweichte Dialysierschläuche und dialysierte 48 Stunden bei 4°C unter ständigem langsamen Rühren gegen Aqua bidest + 0,4 ml Penicillin/Streptomycin/l. Die weitere Einengung erfolgte am Rotationsverdampfer. Aus 100 Häuten konnten so 3 g Lyophilisat gewonnen werden.

Nach Herstellung des Lyophilisats wurde es in 20 ml isotonischer NaCl aufgelöst und bis zur Verwendung in Portionen zu je 1 ml tiefgefroren. 1 ml Dialysat entspricht also dem Lyophilisat (150 mg) aus 5 Häuten.

2.2.4. Perfusion der gesamten Leber

2.2.4.1. Perfusionsmedium

Zur Perfusion wurde ein hämoglobinfreier Puffer, Hank's Lösung, mit folgender Zusammensetzung gewählt:

7,1	g	NaCl	(122 mM)
0,4	g	KCl	(5,36 mM)
0,1	g	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	(0,4 mM)
0,1	g	$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	(1,05 mM)
0,06	g	$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	(0,34 mM)
0,06	g	KH_2PO_4	(0,44 mM)

1 ml Penicillin/Streptomycin
wurden in 1 l Aqua bidest gelöst.

Vor Gebrauch wurden zu 1 l zugegeben:

1,0	g	Glucose	
1,9	g	$NaHCO_3$	(22,5 mM)
0,294	g	$NaCl_2$	(2,0 mM)

Nach Begasung mit Carbogen ergab sich ein pH von 7,2 - 7,4.

2.2.4.2. Operationstechnik

Nach Pentobarbitalnarkose (0,1 ml/100 g Körpergewicht) wird die 24 Stunden zuvor nüchtern gesetzte Ratte in Rükkenlage auf dem Op-Tisch festgesteckt. Die Vena femoralis wird aufgesucht und 0,15 ml Heparin zur Thromboseprophylaxe injiziert. Danach eröffnet man das Abdomen und stellt die V. cava inf. und V. porta dar.

Die V. cava inf. wird oberhalb des rechten Nierenabgangs umschlungen, die V. porta ca. 1,5 cm vor der Einmündung in die Leber. Mit einer zuvor aufgerauhten Braunüle (0,5

Braun Melsungen) wird die V. porta kanüliert. Nachdem man sich überzeugt hat, daß die Braunüle nicht zu weit in Richtung Leber vorgeschoben wurde, wird sie mittels der zuvor gelegten Ligatur gesichert.

Um Luftembolien zu vermeiden, wartet man, bis das Blut aus der Braunüle tropft und schließt erst jetzt das Perfusionssystem an. Gleichzeitig wird mit einem beherzten Schnitt die V. cava inf. unterhalb des Nierenabgangs durchtrennt, sodaß die Leber spontan entblutet und eine einheitlich gelbbraune Farbe annimmt.

Mit einer Peristaltikpumpe erreicht man, daß pro Minute 3,5 - 4,0 ml/g Lebergewicht des mit Carbogen begasten und auf 37,5°C erwärmten Mediums durch die Leber fließen. Eine Luftblasenfalle, zwischen Pumpe und Braunüle eingebaut, soll einer Luftembolie vorbeugen. Jetzt erfolgt die Eröffnung des Brustraums und Darstellung des über dem Zwerchfell gelegenen Teils der V. cava inf.

Um sie werden 2 Schlingen gelegt. Vom rechten Vorhof kommend, schiebt man eine besonders sorgfältig angerauhte Braunüle in die V. cava inf. bis knapp vor dem Diaphragma vor und zieht die Ligaturen zu. Da die Leber später an dieser Braunüle aufgehängt werden soll, werden die Fadenenden der untersten Ligatur über dem Griff der Braunüle nochmals zusammengebunden und sorgen so später für eine zusätzliche Sicherung.

Wenn man jetzt die Ligatur über dem rechten Nierenabgang zuzieht und das Perfusionssystem umsteckt, erfolgt eine Umkehr der Perfusionsrichtung. Das Medium strömt über die V. cava inf. und V. hepatica durch die Leber und tritt aus der Pfortader aus. Jetzt kann die Leber vorsichtig herauspräpariert werden.

Nur eine absolut unversehrt herauspräparierte Leber wird in die Perfusionsapparatur gehängt.

2.2.4.3. Perfusions-Apparatur (Abb. 2)

Die Perfusions-Apparatur basiert mit geringen Modifikationen auf der von Schimassek (65) beschriebenen Anordnung. Perfundiert wird recirculierend über Schwerkraftperfusion (65) in umgekehrter Richtung mit 50 ml Hank B.

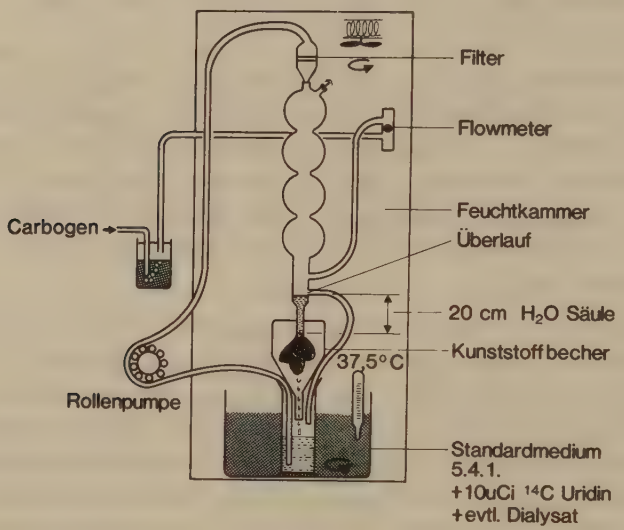

Abb. 2: Perfusionsapparatur - Schwerkraftperfusion

Die Leber liegt nicht auf einer Siebplatte, sondern hängt an der Vena cava inf. Dadurch wird ein Abknicken der Gefäße vor der eingeführten Braunüle verhindert, was sich besonders bei der Schwerkraftperfusion äußerst negativ auf den Flow ausgewirkt hat. Durch Kanülierung der V. cava inf. bis zum Diaphragma wird ein konstanter Durchmesser des zuführenden Gefäßes garantiert, das sich durch das Eigengewicht der Leber der Braunüle anlegt. Die eingeführte

Braunüle verhindert darüber hinaus ein Abschnüren oder Abdrillen des Gefäßes.

Durch den hydrostatischen Druck Δh ca. 20 cm stellt sich ein konstanter Flow ein, der nach Versuchsende exakt bestimmt wird. Überschüssiges Medium kann über einen Überlauf ins Sammelgefäß zurückfließen.

Jetzt gibt man dem Perfusionsmedium 10 µCi ^{14}C Uridin zu. Nach exakt 45 Minuten wird die Leber aus der Perfusions-Apparatur genommen und aufbereitet.

Um die Versuchsanordnung auf ihre Tauglichkeit zu prüfen und das Verfahren zu erlernen, wurden zunächst Hepatocyten isoliert und deren Vitalität mit dem Trypanblautest bestimmt. Nach einer Einarbeitungsphase wurden routinemäßig Vitalitäten von 90 % erreicht.

2.2.5. Aufbereitung

Nach Entfernung nicht organspezifischen Gewebes und vorsichtigem Abtrocknen wird die Leber gewogen und 1 Minute bei 5000 rpm unter Kühlung in einem Bühler-Homogenisator homogenisiert. Dabei werden pro Gramm Leber 15 ml eiskalte isot. NaCl und 0,3 ml Heparin-Natrium zugegeben. Anschließend wird das Homogenisat gepottert, 6 Proben zu je 150 µl entnommen und unter starkem Rütteln (Vortex) in 5 ml eiskalter 5 %iger TCA gefällt.

Bis zu diesem Zeitpunkt ist es wichtig, immer unter Kühlung und möglichst schnell zu arbeiten. Zudem wird darauf geachtet, daß die einzelnen Arbeitsabläufe bei den verschiedenen Versuchen annähernd die gleiche Zeit in Anspruch nehmen und so der Fehler durch eine - wenn auch in geringem Maße - weiterlaufende RNA-Synthese konstant gehalten wird. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß dies bis zur Homogenisierung besonders wichtig ist.

Nach 30 Minuten werden die Proben auf einer Vacuumflasche abfiltriert. Um ein vollständiges Auswaschen von nicht eingebautem ^{14}C Uridin zu gewährleisten, wird 5 mal mit je 5 ml TCA nachgespült. Die Filterblättchen werden mindestens 6 Stunden bei 40°C getrocknet, dann zusammen mit 10 ml Quickszint in ein Szintillationsfläschchen gegeben und in einem β-Counter 10 Minuten gezählt.

Nach Versuchsende wurden sämtliche Glasgefäße (z.B. multibulb glass oxygenator) peinlich gesäubert, Schlauchsysteme und Filter erneuert. So sollte

1. einer Anreicherung von Radioaktivität im System während der Versuche vorgebeugt werden;
2. verhindert werden, daß es zu einer Infektion durch Mikroorganismen kommt, die ihrerseits RNA synthetisieren und dadurch die Meßergebnisse verfälschen können (65).

2.2.6. Anmerkungen zur Schwerkraftperfusion

Bei Verwendung synthetischer Perfusionsmedien wie Hank B wird ein Flow von 3 - 3,5 ml/g·min für optimal angesehen (89).

Während bei der Vorperfusion mit Hilfe einer Pumpe immer ein Flow dieser Größe erreicht werden konnte, war dies bei der Schwerkraftperfusion mit 20-25 cm H_2O Säule fast nie möglich. Die gemessenen Flowraten schwankten um 2 ml/min·g. Gleiche Durchflußraten werden in der Literatur für semisynthetisches Medium angegeben (65).

Schwankungen im Flow haben Einfluß auf den O_2-Verbrauch (89) der Zellen und damit auf alle aeroben Prozesse (z.B. ATP-Bildung in den Mitochondrien über aerobe Substrat-Oxidation).

Für Flowraten < 3 ml/min·g beschreibt Sugano eine lineare Abhängigkeit zwischen O_2-Verbrauch und Flowrate. Zwei

Lebern, die verschiedene Flowraten aufweisen, aber sonst unter identischen Bedingungen perfundiert wurden, werden also verschiedene Syntheseraten (hier speziell RNA-Syntheseraten) haben.

Ein Vergleich ist nur möglich, wenn man dies berücksichtigt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Flowrate ml/min für jede Leber und deren Gewicht bestimmt. Der daraus errechnete relative Flow ml/min·g wurde zu den gemessenen counts in Beziehung gesetzt.

2.2.7. Hepatocytenisolierung

2.2.7.1. Vorperfusion

Die Leber wird in derselben Weise herauspräpariert wie zur Leberperfusion, mit dem Unterschied, daß die Vorperfusion, die jetzt mindestens 10-12 Minuten dauern soll, mit Ca^{++}-freiem Standardmedium durchgeführt werden muß. Die nicht recirculierende Durchführung der Vorperfusion sorgt dafür, daß auch das noch in der Leber vorhandene Ca^{++} ausgewaschen wird.

Dadurch will man den Zusammenhalt der Leberzellen lockern (24) und die vollständige Leberdissoziation vorbereiten. Offensichtlich gibt es nämlich einen Calcium-abhängigen Adhäsionsfaktor, der für den Zusammenhalt der Zellen (mit-) verantwortlich ist (55,81).

2.2.7.2. Perfusion mit Collagenase (Abb. 3)

Die herauspräparierte Leber wird in der Perfusionsapparatur auf eine Siebplatte gelegt und nach Ausschluß an ein recirculierendes Perfusionssystem mit einem Becherglas abgedeckt (Bildung einer feuchten Kammer).

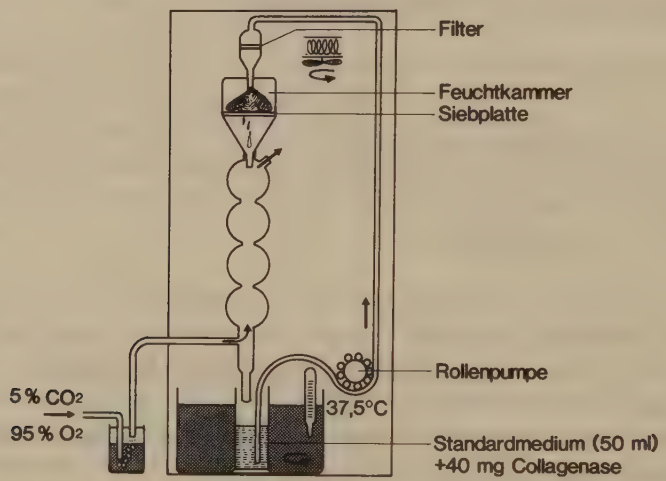

Abb. 3: Perfusionsapparatur

Im Gegensatz zur oben beschriebenen Leberperfusion wird das zur Perfusion nötige Druckgefälle hier durch eine Peristaltikpumpe aufgebaut, die für einen Flow von 35-40 ml sorgt.

Jetzt gibt man den 100 ml Perfusionsmedium (= Medium der Vorperfusion) 40 mg Collagenase und 2 mmol $CaCl_2$ zu. Auf die Zugabe von Ca^{++} soll hier nicht verzichtet werden, da einerseits die Collagenase durch Ca^{++} aktiviert wird (16, 30), andererseits Ca^{++} für die Funktionsfähigkeit und In-

tegrität von Zelle und Zellmembran von großer Bedeutung ist (7,8,78).

Zellen, die mit Ca^{++}/Collagenase isoliert worden sind, erfüllen verschiedene Vitalitätskriterien besser (8).

Sobald die Leber matschig wird und zu fließen beginnt (nach ca. 20 Min.), wird sie aus dem Perfusionssystem genommen. In einer Petrischale zieht man unter ständiger Begasung die die Leber noch umschließende capsula fibrosa mit 2 Pinzetten ab und schüttelt die Leberzellen aus. Die erhaltene Zellsuspension wird durch ein Nylonnetz (Maschenweite 150 µ) filtriert; Bindegewebsreste bleiben dadurch zurück. Durch dreimaliges Zentrifugieren bei 300 rpm (∿ 1 min), Absaugen des Überstandes und erneutes Auffüllen mit Medium werden die Zellen gewaschen.

2.2.7.3. Prüfung der Vitalität

Im Laufe des Isolationsvorganges können die Zellen auf vielfältige Art und Weise geschädigt werden (8). Die Vitalitätsprüfung ist somit für die Verwendung isolierter Leberzellen von ausschlaggebender Bedeutung.

Als Vitalitätstest wurde hier der Trypanblautest durchgeführt.

Trypanblautest:
Repräsentative 100 µl Zellsuspension werden unmittelbar nach Isolierung mit der gleichen Menge Trypanblau versetzt. Der Anteil blau gefärbter Zellen wird unter dem Mikroskop in der Neubauer Zählkammer ermittelt. Mindestens 90 % Vitalität werden angestrebt.

2.2.8. Inkubation

2.2.8.1. Bestimmung physiologischer Mengenverhältnisse zur Inkubation

Die Hepatocytoensuspension wird auf 2,5 x 10^6 Zellen verdünnt. Davon werden pro Inkubationsansatz 2,5 ml, also 6,25 x 10^6 Zellen eingesetzt, die von 100 µl Serum umspült werden. Zieht man in vivo-Verhältnisse zum Vergleich heran, so gilt:

Eine 350 g Ratte hat 23 ml Blut (88), d.h. 12,5 ml Serum (88).

800 x 10^6 Zellen werden von 12,5 ml umspült.

6,25 x 10^6 Zellen werden von $\frac{12,5}{800}$ x 6,25 ml umspült $\hat{=} \sim 98$ µl.

Damit werden durch Inkubation mit 100 µl Serum annähernd physiologische Verhältnisse erreicht.

2.2.8.2. Messung der RNA-Synthese

Zur Bestimmung der RNA-Synthese werden jeweils in eine Ecke der Inkubationsgefäße 50 µl ^{14}C-Uridin und in eine andere 100 µl der in ihrer Wirkung zu untersuchenden Substanz (Serum) gegeben. In 2-min. Abstand fügt man 2,5 ml Hepatocytensuspension zu. Sobald die Hepatocyten im Inkubationsgefäß sind, wird die Zeit gemessen.

Jetzt stellt man das Inkubationsgefäß in die auf 37°C tempertierte Schüttelapparatur, in der mit Carbogen begast wird.

Jeweils nach 30 min gibt man 200 µl aus den verschiedenen Inkubationsröhrchen in ein Stoppbad aus 5 ml 5 %iger TCA. Nach mindestens 30 min werden die Zellen über einen Glass Microfibre Filter abfiltriert.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt in der gleichen Weise wie bei der homogenisierten Leber bereits beschrieben - nachspülen, trocknen, zählen.

2.2.9. Statistik

Die Meßergebnisse eines Versuchskollektivs wurden gemittelt und, wenn nicht besonders erwähnt, das Vertrauensintervall berechnet. 95 % aller zusätzlich ermittelten Einzelwerte kann man in diesem Bereich erwarten.

Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit Hilfe des Student-t Testes geprüft.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit < 5 % wurde von einem signifikanten, bei einer Wahrscheinlichkeit < 1 % von einem hochsignifikanten Unterschied ausgegangen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Wirkung niedermolekularer Fraktionen verbrannter Haut auf die RNA-Synthese der perfundierten Rattenleber

Nachdem die Leber in der Perfusionsapparatur hing, alle wichtigen Parameter (Flow, Begasung, Temperatur) eingestellt waren und mit denen der Kontrollen übereinstimmten, wurde dem Perfusionsmedium (50 ml) Dialysat (1 ml/0,5 ml) und ^{14}C Uridin (10 µCi) zugesetzt und mit der Zeitmessung begonnen.

Untersucht werden sollte, ob und in welchem Umfang das Dialysat den Einbau von ^{14}C Uridin in die RNA beeinflußt.

Zunächst wurde 1 ml Dialysat, entsprechend 5 Mäusehäuten (5 x ∿ 16 cm^2) eingesetzt.

Die Menge wurde so gewählt, zum einen

a) um die ermittelte RNA-Syntheserate mit der bei in vivo verbrannten Ratten vergleichen zu können.

Dort sollten nämlich 80 cm^2, entsprechend 30 % der Körperoberfläche verbrannt werden.

Zum anderen gibt

b) Schönenberger (85) eine Letaldosis des VT von 0,35 mg/g Körpergewicht an.

Bei der gewählten Dialysatkonzentration von 150 mg/ml wird die Leber einer 300 g-Ratte bei Einsatz von 1 ml (0,5 ml) Dialysat mit 0,5 (0,25) mg/g inkubiert.

Exakt nach 45 Minuten wurde die Leber aus der Apparatur genommen und der Uridineinbau gestoppt. Die Kontrollen wurden analog behandelt. Der Unterschied lag lediglich darin, daß statt Dialysat die entsprechende Menge isotonischer NaCl zugesetzt wurde.

Der Vergleich der beiden Kollektive ergab nach Dialysatgabe (1 ml) eine Erniedrigung auf 26,6 % des Kontrollwertes.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den von Bruchelt ermittelten Werten (16).

Selbst nach Reduktion der zugesetzten Dialysatmenge auf 0,5 ml (entsprechend einer 15 %igen Verbrennung) zeigte sich noch ein sehr deutlicher Hemmeffekt (Abb. 4/Tab. 4): Die RNA-Syntheserate erreichte 42,5 % des Ausgangswertes. Damit wurden die an isolierten Hepatocyten gefundenen Effekte bestätigt.

Eine mögliche Reduktion der RNA-Syntheserate durch Antibiotika (Penicillin/Streptomycin), die eine bakterielle Kontamination während der Aufarbeitung des Dialysats vermeiden sollen, wurde in einer früheren Arbeit ausgeschlossen (16).

Ebenso wurde gefunden, daß auch das Dialysat aus unverbrannter Haut einen, wenn auch nicht so starken, hemmenden Effekt ausübt (16).

Elektrolyte, pH, Osmolarität der Homogenisate verbrannter und unverbrannter Haut lassen einen wesentlichen Unterschied in der Wirkungsweise auch nicht erwarten (28). In keinem Fall nämlich weicht der Wert für verbrannte Haut vom Wert für unverbrannte Haut in einer Weise ab, der eine toxische Wirkung verbrannter Haut erklären könnte.

Es lag deshalb der Schluß nahe, daß die hemmende Wirkung auf die RNA-Synthese einer oder mehreren Substanzen zuzuschreiben ist, die durch Freisetzung aus dem Gewebe wirksam werden (16) - sei es durch ein Verbrennungstrauma oder in vitro durch entsprechende Aufbereitung unverbrannter Haut.

Die etwas höhere Aktivität der Fraktion aus verbrannter Haut könnte damit erklärt werden, daß die starke Schädigung des Gewebes bei Hitzeeinwirkung die Freisetzung der Fraktion im Vergleich zum unverbrannten Gewebe erleichtert (16).

Bisher konnte gezeigt werden, daß an der perfundierten Leber unbehandelter Tiere niedermolekulare Fraktionen verbrannter Haut die RNA-Synthese hemmen. Unklar war, ob bei in vivo Verbrennungen ähnliche Effekte nachweisbar sind.

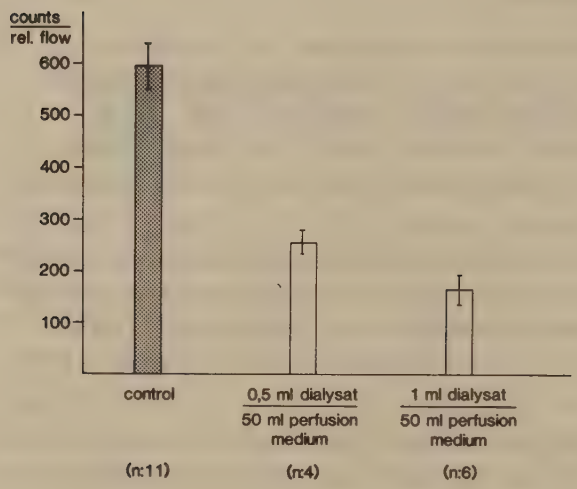

Abb. 4: RNA-Synthese der Rattenleber nach Zugabe niedermolekularer Fraktionen verbrannter Mäusehaut zum Perfusionsmedium.

Tabelle 4:

Perfusionsmedium	+ isot. NaCl (Kontrollen)	+ 1 ml Dialysat	+ 0,5 ml Dialysat
n	11	6	4
counts/ rel. Flow	597 (± 79)	159 (± 18)	254 (± 17)

3.2. Wirkung standardisierter Verbrennungen auf die RNA-Synthese der perfundierten Rattenleber

Nach standardisierter Verbrennung und Schockprophylaxe wurde die Leber verbrannter Tiere nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 Tagen isoliert perfundiert.

Die Ergebnisse vom 2., 5., 7., 14. Tag nach Verbrennung wurden statistisch ausgewertet.

Am 2. Tag war keine signifikante Veränderung feststellbar.

Am 5. Tag dagegen war eine hochsignifikante Erniedrigung auf 71,5 % des Kontrollwertes zu messen.

Auch am 7. Tag war die Erniedrigung hochsignifikant. Die RNA-Syntheserate betrug 74,5 % der Kontrollen (Abb. 5/ Tab. 5). Wenn Tiere starben, dann nach dem 7. Tag.

Es wurde deshalb die RNA-Synthese nach 14 Tagen gemessen. Es fand sich zwar eine Erniedrigung auf 83%; sie fiel jedoch geringer aus als erwartet.

Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Zeit ungefähr 1 Woche nach Verbrennung eine Art Scheideweg darstellt: entweder erliegen die Tiere der Noxe, oder sie erholen sich zunehmend davon.

Messungen konnten natürlich nur an letzteren durchgeführt werden, d.h. an Tieren, die sich offensichtlich im Stadium der Rekonvaleszenz befinden und damit die typische Symptomatik nur noch in abgeschwächter Form zeigen.

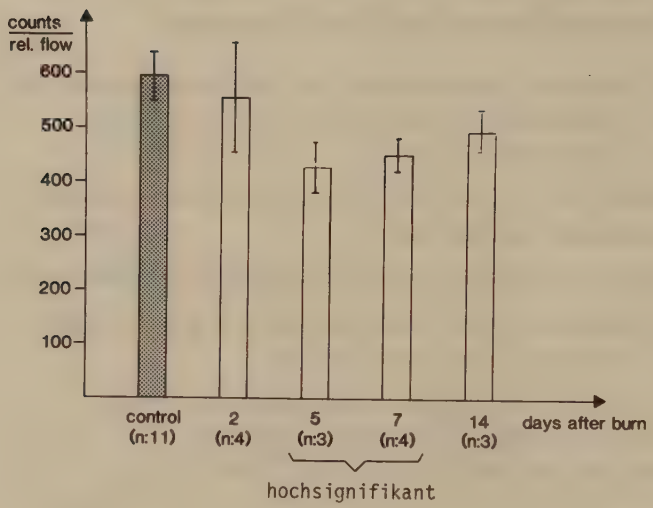

Abb. 5: RNA Synthese der Rattenleber nach standardisierter Verbrennung (2, 5, 7, 14 Tage)

Tabelle 5:

	Kontr.	2 Tg n.V.	5 Tge n.V.	7 Tge n.V.	14 Tge n.V.
n	11	4	3	4	3
counts/ rel.Flow	597 (±79)	559 (±103)	430 (±51)	446 (±21)	494 (±39)

3.3. Inkubation isolierter Hepatocyten mit niedermolekularen Fraktionen, gewonnen aus Seren verbrannter Tiere

Sowohl Dialysate aus verbrannter Haut als auch standardisierte Verbrennungen erniedrigen die RNA-Synthese.

Einmal wurde die aus 80 cm^2 verbrannter Haut gewonnene Substanz direkt dem Perfusionsmedium zugesetzt, das andere Mal wurden am Tier 80 cm^2 rasierte Rückenhaut in vivo verbrannt.

Der beobachtete schwächer hemmende Effekt bei <in vivo> Verbrennungen ließe sich durch eine unvollständige Resorption, ferner durch Abwehr- und Adhäsionsmechanismen sowie Verteilung der Wirkstoffe auf den gesamten Körper erklären. Die Traumatisierung des Tieres, der Wasserverlust und weitere durch die Verbrennung gesetzte Noxen, die eine stärkere Reaktion des Tieres erwarten ließen, bleiben hierbei unberücksichtigt.

Es wurde nun angestrebt, die Effekte:
Zugabe von Dialysat → Senkung der RNA-Synthese und
Verbrennung → Senkung der RNA-Synthese
durch den Versuch zu verbinden, aus dem Serum verbrannter Tiere durch Ultrafiltration Substanzen zu isolieren, die mit dem Dialysat vergleichbar sind und die die RNA-Synthese in derselben Weise beeinflussen.

Dazu wurden isolierte Hepatocyten mit dem Ultrafiltrat aus gepoolten Seren verbrannter Ratten 30 Minuten lang inkubiert und die Einbaurate von ^{14}C Uridin bestimmt.

Getestet wurden Seren, die 2 und 5 Tage n.V. gewonnen worden waren. Als Kontrolle wurden Inkubationen mit den Seren unverbrannter Ratten durchgeführt. Die Einbauraten wurden jeweils direkt mit der Kontrollgruppe verglichen.

Jedoch zeigten weder die 2 Tage n.V. noch die 5 Tage n.V. gewonnenen Seren irgendwelche signifikanten Effekte.

Verdünnungen der zugesetzten Substanzen machten sich in der Einbaurate nicht bemerkbar (Abb. 6/Tab. 6).

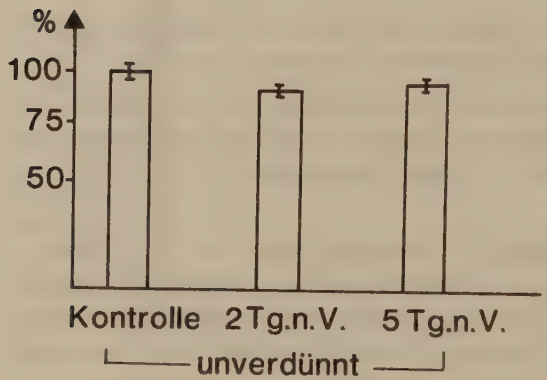

Abb. 6:

Tabelle 6:

Inkubation mit - filtriertem	counts ± prozent. Fehler	in %
Serum--------Unverbrannte		
unverdünnt	1590 ± 41	100 ± 2,6
verdünnt 1:100	1583 ± 41	
Serum--------2 Tge n.Verbr.		
unverdünnt	1494 ± 39	94 ± 2,6
verdünnt 1:100	1504 ± 39	
Serum--------5 Tge n.Verbr.		
unverdünnt	1523 ± 40	96,8 ± 2,6
verdünnt 1:100	1616 ± 42	

prozent. Fehler = $\frac{1}{\sqrt{c}}$ (c = counts)

3.4. Inkubation isolierter Hepatocyten mit Seren verbrannter Tiere

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß evtl. toxische Substanzen durch das Filter (Ausschlußgrenze 30 000 U) zurückgehalten werden könnten, wurden Inkubationen mit unfiltrierten Seren durchgeführt. Verschiedene Autoren (28, 76) schreiben hochmolekularen Fraktionen eine toxische Wirkung zu und geben die Isolierung nicht dialysierbarer und nicht ultrafiltrierbarer toxischer Substanzen an, die in erhitzten Geweben entstehen.

Es gelang jedoch auch hier nur, die zuvor mit filtrierten Seren gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen (Abb. 7/Tab. 7).

3.5. Letalität

Trotz der relativ großflächigen Verbrennungen von ca. 30 % war die Letalität nur gering und entsprach bei weitem nicht den in der Literatur bei Mäusen (85) beschriebenen Raten. Von 25 Tieren starben 3 (nach 8, 13 und 14 Tagen).

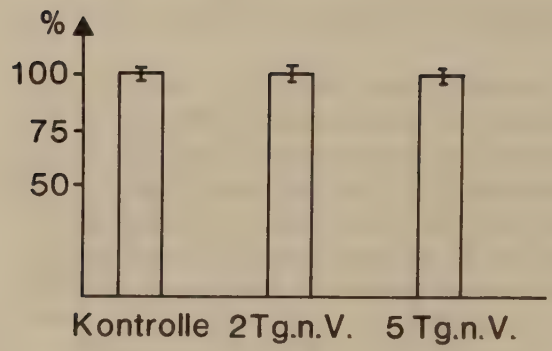

Abb. 7:

Tabelle 7:

Inkubation mit - unfiltriertem		counts ± prozent. Fehler		in %
Serum -	- Unverbrannte	V_1	2579 ± 52	100 ± 2
		V_2	2980 ± 54	100 ± 1,8
Serum -	- 2 Tge n.Verb.	V_1	2560 ± 51	99,6±2
		V_2	2924 ± 53	98,1±1,8
Serum -	- 5 Tge n.Verb.	V_1	2536 ± 50	98,3±2
		V_2	3277 ± 59	110 ± 1,8

prozent. Fehler = $\frac{1}{\sqrt{c}}$ (c = counts)

3.6. Lebergewicht und Flow nach Verbrennung bzw. Zugabe niedermolekularer Fraktionen aus verbrannter Haut zum Perfusionsmedium - Beobachtungen

Während der Durchführung der Versuche fiel zum Teil auf, daß die Leber verbrannter Tiere im Vergleich zu denen der Kontrolltiere vergrößert war. Dieser Befund erstaunte zwar, wurde aber nicht weiter verfolgt, sodaß die Lebergewichte der Ratten routinemäßig zwar erfaßt wurden, nicht aber deren Gesamtgewicht.

Eine Relativierung der beiden Größen ist daher jetzt nicht mehr möglich.

Eine genauere Untersuchung dieser Beobachtung wäre in einer nachfolgenden Arbeit interessant; sind doch nach Intoxikation mit Phalloidin, einem leberspezifischen Pilzgift, ebenfalls schwammartig vergrößerte Lebern beschrieben.

Das Toxin bewirkt eine Vacuolisierung, wodurch es zu einer hochgradigen Expansion der Leberzellen kommt. Dies führt nicht nur zu einer raschen Vergrößerung des Gesamtorgans, sondern auch zu einer Kompression der Blutgefäße (26).

Tatsächlich wurde sowohl nach Zugabe von Dialysat als auch bei den verbrannten Tieren eine Verminderung der Flowrate gefunden.

So war bei Tieren, deren Leber zwischen dem 5. und 14. Tag perfundiert wurde, der Flow hochsignifikant erniedrigt (Abb. 8/Tab. 8).

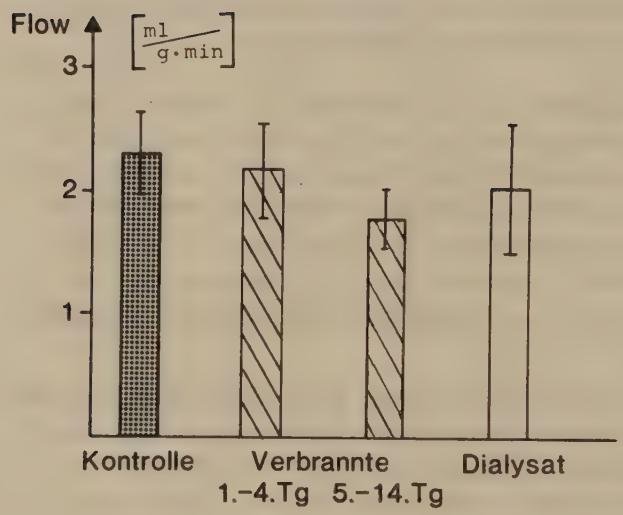

Abb. 8:

Tab. 8: Leberflow nach Verbrennung und Gabe von Dialysat (ml/g·min)

	Kontrollen	Verbrannte (1.-4. Tg n.V.)	Verbrannte 5.-14. Tg n.V.)	Dialysat
n	10	7	11	6
Mittelwert (Vertrauens-intervall)	2,29 (±0,35)	2,18 (±0,42)	1,80 (±0,27)	2,02 (±0,55)

4. DISKUSSION

An der verbrannten Oberfläche wird der Körper seines natürlichen Schutzmantels beraubt. Es kommt zu erhöhter Wasserverdunstung und Wärmeabgabe, die bis zu 3000 Kalorien pro Tag betragen kann (40). Eine Kompensation dieser Energieverluste wird durch Steigerung der metabolischen Wärmeproduktion erreicht. Gewonnene Energie wird also nicht in Form von ATP gespeichert und für Syntheseprozesse bereitgehalten, sondern zum überwiegenden Teil als Wärme freigesetzt. Experimentell läßt sich eine Senkung der Glykogen- und Proteinsynthese nachweisen (74), wobei man sogar zeigen konnte, daß das Ausmaß der Glykogensynthese von der Zahl der ATP-abhängigen Stoffwechselschritte direkt abhängt (74).

Läge die Ursache für die Komplikationen bei Verbrennungen aber allein in einem Energie-Mangel, so müßte eine Kompensation der Wärmeverluste neben der Zufuhr von Flüssigkeit und hochkaloriger Ernährung zum Erfolg führen. Klinisch läßt sich eine Besserung - wenn auch bei weitem nicht im erwarteten Ausmaß - nachweisen.

Geht man davon aus, daß die Ursache in einer generalisierten Sepsis durch Bakterientoxine liegt, so müßte eine gezielte Antibiotikatherapie Heilung bringen. Auch hier wird von Erfolgen in der Literatur berichtet (16).

Interessanterweise wird die Infektion von Bakterien verursacht, die dem Menschen normal kaum gefährlich werden können (77). Es wird hierbei also mehr die Verminderung der körpereigenen Abwehrmaßnahmen im Vordergrund stehen als die Virulenz der eindringenden Keime.

So geht nach schweren Verbrennungen vorübergehend die Fähigkeit verloren, Antikörper gegen neue Antigene zu bilden, die nicht zur normalen Flora des menschlichen Körpers gehören - z.B. gegen Pseudomonas aeruginosa. Weiterhin wurde

beobachtet, daß neutrophile Leukozyten Bakterien zwar noch phagocytieren, aber nicht mehr auflösen können.

Die Funktion der Granulocyten bezüglich Phagocytose, Chemotaxis und intracellulärem Killing ist ebenfalls eingeschränkt (1). Die Bedeutung dieser immunologischen Veränderungen wird in ihrer Tragweite dadurch klar, daß Infektionen durch Keime wie Pseudomonas aeruginosa schwer zu behandeln sind, da diese Bakterien häufig gegen übliche Antibiotika resistent sind (23).

Als Folge davon kommt es trotz frühzeitigem Ausgleich der Störungen im Wasser- und Elektrolyt-Haushalt, trotz stabilem Kreislauf und antibiotischer Abdeckung dazu, daß der Patient somnolent wird und letztendlich stirbt. Dieser immer wieder zu beobachtende Verlauf führte zu grundlegendem Umdenken.

4.1. Verbrennungsprodukte der Haut - Wirkungen und mögliche Angriffspunkte

Ein Vorwärtskommen erwartete man sich von dem Konzept, toxische Substahzen aus der Haut als Ursache für die Verbrennungskrankheit enger in Betracht zu ziehen:
Eine Basler Versuchsgruppe um Allgöwer gab die Isolierung eines relativ einfach gebauten VT an, das bei Verbrennung durch Trimerisierung aus einem Nativ entsteht.
Seine Wirkung konnte jedoch nicht objektiviert werden.

Daneben wurde die Isolierung niedermolekularer Verbindungen aus verbrannter Mäusehaut sowie deren Einfluß auf die Stoffwechselleistungen der Zelle beschrieben (16).

Diese Verbindungen, die, wenn man so will, die Reihe der bisher isolierten Verbrennungs-Toxine weiter fortsetzen (9, 25, 57, 61-64), erniedrigen die RNA-Synthese und zeigen diesen Effekt auch an der isoliert perfundierten Leber.

Damit wurde der Auffassung widersprochen, daß niedermolekulare Stoffe als V-Toxine auszuschließen sind (28).

Von Interesse ist, inwiefern eine Beeinflussung der RNA-Syntheserate durch die niedermolekularen Substanzen des Dialysats möglich ist, und in welchem Zusammenhang sie mit der am Ganztier n.V. ebenfalls beobachteten Erniedrigung steht.

Als mögliche Erklärung der durch das Dialysat hervorgerufenen Effekte würde sich eine Aktivierung spezifischer Inhibitoren anbieten.

So ist z.B. eine Beeinflussung der RNA-Polymerase im Sinne einer spezifischen Blockierung denkbar.

Experimentell ist dies bei Eukaryonten mit Amanitin möglich (38) und wird therapeutisch zur Bekämpfung von Prokaryonten im Eukaryontenorganismus durch Gabe des Antibiotikums Rifampicin ausgenutzt (87).

Erste Versuche deuten darauf hin, daß der Angriffspunkt bestimmter Dialysatfraktionen an der Polymerase liegt (3).

Führt man sich das Schema der Abbildung 9 vor Augen, so wird ersichtlich, daß eine Beeinflussung der RNA-Konzentration im Cytoplasma auch auf anderen Ebenen möglich ist.

Über eine Regulation der Genaktivität kann eine Anlagerung der Polymerase am DNA-Strang und damit eine Transkription völlig verhindert werden (vgl. Actinomycinwirkung bei Prokaryonten) (17,87).

Dies ist z.B. auf dem Wege der negativen und positiven Regulation möglich (19).

Bei der positiven Regulation sorgt cAMP durch Anlagerung an den Promotor dafür, daß das Operon für die RNA-Polymerase erkennbar wird.

Da die Konzentration von cAMP in der Zelle durch seine Auf- und Abbauenzyme reguliert wird, ist leicht vorstellbar, daß andere Stoffwechselprodukte und auch Toxine die Synthese und damit die Konzentration der betreffenden Enzyme re-

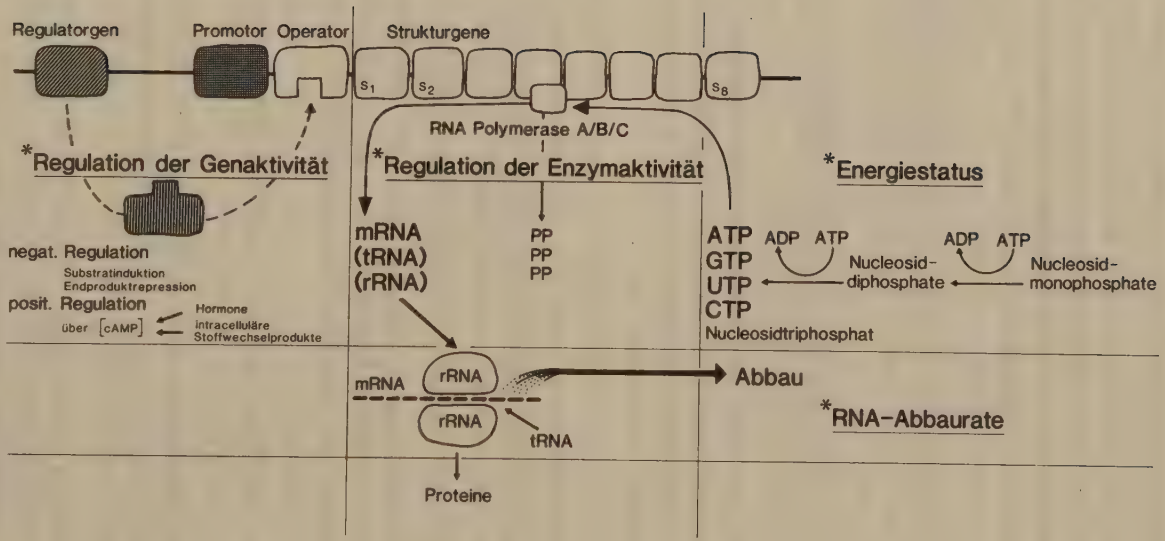

Abb. 9: Beeinflussung der RNA Konzentration der Zelle möglich über Beeinflussung der *

gulieren und so einen Einfluß auf die durch cAMP gesteuerten Operone ausüben. (Die beschriebenen Mechanismen sind bei Prokaryonten gesichert, bei Eukaryonten werden sie als sicher angesehen.) (87)

Ob die Polymerase die einzelnen Nukleotide zu einer Kette verknüpfen kann, hängt in entscheidendem Maße von deren Energiegehalt ab.

Eine verminderte RNA-Synthese kann ihren Grund demzufolge auch in einer fehlenden Aktivierung der Bausteine (Nucleoside) haben, die über ATP erfolgt. Ein Mangel an ATP läßt sich über eine Einschränkung der oxidativen Phosphorilierung als Hauptsystem der ATP-Regeneration erklären. Hier liegt ein weiterer möglicher Angriffspunkt des Dialysats.

Dabei kann das Dialysat entweder wie von Kremer (43,44) beschrieben zu einer vacuoligen Degeneration der ganzen Mitochondrien führen oder direkt in die Atmungskette eingreifen und dort zu einer Entkoppelung führen (40). Daß diese Entkoppelung nur an Lebermitochondrien, nicht aber an Skelettmuskelmitochondrien beobachtet wurde (4), unterstreicht die Spezifität der Wirkung.

Letztendlich münden beide Effekte in ein Energiedefizit, also einen veränderten ATP/AMP Quotienten.

Kröner beschreibt eine solche Energiestoffwechselstörung (77). Sie allein reicht zur vollständigen Erklärung der Effekte jedoch nicht aus, da durch sie generell alle Syntheseprozesse in Mitleidenschaft gezogen werden müßten.

Tatsächlich wurde jedoch beobachtet, daß nur die Synthese der Leberproteine signifikant vermindert ist (47), während die Synthese der Plasmaproteine, die zum Großteil ebenfalls in der Leber abläuft, unbeeinflußt bleibt. Neben den bereits weiter oben beschriebenen Mechanismen können für diese spezifischen Effekte übergeordnete Regulationsvorgänge durch Hormone verantwortlich sein.

Diskutiert wird aber auch der spezifische Angriff eines Toxins an der Membran (40,77) mit Beeinflussung der Informationsübertragungsmechanismen.

Darüber hinaus wäre noch an einen beschleunigten Abbau der RNA bei unveränderter Syntheserate zu denken. Ein solcher Zusammenhang konnte jedoch bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden.

4.2. Nach Verbrennungstrauma beobachtete Stoffwechselveränderungen - mögliche Ursachen und Zusammenhänge

Es stellt sich die Frage, ob einerseits die durch Zugabe von Dialysat (16) andererseits die durch in vivo Verbrennung hervorgerufenen ähnlichen Effekte (43,75) eine gemeinsame Ursache haben. Daß durch die Verbrennung eine Vielzahl thermisch veränderter Bestandteile in der Haut entsteht und freigesetzt wird, scheint gesichert (62).

Die einzige Möglichkeit, diese Frage eindeutig zu beantworten, läge jedoch in einer Isolierung und Identifizierung niedermolekularer Substanzen im Serum Verbrannter. So wäre ein Vergleich dieser Stoffe mit den Substanzen des Dialysats möglich.

In der Literatur wird von der Isolierung cardio- und neurotoxischer Substanzen (64,84) sowie einem toxischen makromolekularen Lipoproteinkomplex (45) aus dem Serum Schwerverbrannter berichtet.

Wenn im Rahmen dieser Arbeit aus Serum keine toxische Fraktion isoliert werden konnte, so widerlegt dies nicht einen evtl. bestehenden Kausalzusammenhang zwischen einer Substanz aus verbrannter Haut und Erniedrigung der RNA-Synthese, sondern kann ebenso anderen Umständen zuzuschreiben sein.

Schwierig ist z.B. die Wahl des Zeitpunktes für die Entblutung des Tieres. (Es wurde nach 2 und 5 Tagen entblutet).

Darüberhinaus kann die Aufenthaltsdauer der Moleküle im Serum als ziemlich kurz angenommen werden, zeigt das Toxin

doch eine große Affinität zu (Organ-) Parenchymzellen (77,92).

Es wird also letztendlich sehr schwierig sein, die Substanzen in solchen Konzentrationen zu isolieren, daß bei Inkubation ein signifikanter Effekt entsteht.

Im Moment müssen deshalb für die Erklärung der am Ganztier beobachteten Effekte mehrere Ursachen in Betracht gezogen werden, die möglicherweise erst in ihrer Kombination die beobachteten Wirkungen hervorrufen.

Natürlich können am Ganztier sämtliche an der isolierten Leber beschriebenen Effekte ebenfalls auftreten und so den Leberstoffwechsel (speziell die RNA-Synthese) beeinflussen. So konnte z.B. Kremer (71) die nach Gabe von VT gefundene vacuolige Degeneration der Mitochondrien auch am verbrannten Ganztier nachweisen.

Die massive Vacuolisation der Mitochondrien am 7. Tag (43, 44,75) korreliert sehr schön mit der gefundenen stärksten Senkung der RNA-Synthese zu diesem Zeitpunkt. Auch der bis zum 10. Tag (46) laufende Abfall des ATP Anteils deckt sich gut mit der zunehmenden Senkung der RNA-Synthese.

Daneben muß am lebend verbrannten und erst nach mehreren Tagen getöteten Tier noch an Einflüsse durch Endo- und Exotoxine, Hormone sowie an weitere Auswirkungen des Gesamtmetabolismus gedacht werden.

Toxine

Verbrannte sind gegenüber bakteriellen Infekten erhöht anfällig (40). Bakterien, deren Angriff normalerweise abgewehrt wird, führen zu einer Infektion (77), deren Wirkung durch das bei der Verbrennung gebildete Toxin erheblich gesteigert wird (77).

Außerdem findet man eine mit dem Ausmaß der Verbrennung abnehmende Bildung von Antikörpern (41) gegen bakterielle Antigene, eine Hemmung des RES (48) sowie einen vermin-

ten Enzymgehalt neutrophiler Leukozyten (41), die dadurch Bakterien nicht mehr auflösen können.

Es läßt sich nun leicht vorstellen, daß bakterielle Toxine (Exotoxine) in Kombination mit toxischen Substanzen aus der verbrannten Haut das zentrale Stoffwechselorgan Leber doppelt belasten.

Neben der Belastung des Körpers durch die o.g. Toxine führt die bei Verbrennungen häufig zu beobachtende Darmparalyse zu einer massiven Vermehrung der Bakterien im Intestinaltrakt. Nach Lyse freiwerdende Endotoxine werden resorbiert und im Körper verteilt.

Im Tierexperiment werden nach Endotoxingabe Stoffwechselstörungen beobachtet, wie sie zum Teil auch nach Verbrennungen auftreten (14,52). Bei der Wertung dieser Beobachtung sollte man jedoch berücksichtigen, daß Endotoxine wesentlich weniger toxisch sind als Exotoxine.

Ebenfalls einer toxischen Komponente werden die von Schölmerich beobachteten Protrusionen (45,73) zugeschrieben; sie sind den Veränderungen ähnlich, die an isolierten Zellen nach Phalloidinvergiftung gefunden wurden.

Untersuchungen in unserem Labor durch Bruchelt bestätigten diesen Befund zwar, jedoch sind die Protrusionen in quantitativer Hinsicht kaum von denen der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Das Ausmaß der Phalloidinschädigung wird nicht annähernd erreicht (16).

Wurde eingangs eine zum Teil beobachtete Schwellung der Leber und ein signifikant erniedrigter Flow bei verbrannten Tieren geschildert, so könnte dies auch auf einen Stau oder eine falsche Elektrolytzusammensetzung des Perfusionsmediums zurückzuführen sein. Letzteres wurde durch laufende Kontrolle ausgeschlossen.

Ein Stau kann bei der gewählten Versuchsanordnung, bei der die Leber im System hängt, das abführende Gefäß somit nicht verlegt werden kann, und darüberhinaus das Perfusionsmedium einen Filter passiert, ebenfalls ausgeschlos-

sen werden. Außerdem ist die bei einem Stau auftretende Volumenzunahme reversibel, würde sich also, sobald die Leber aus der Perfusionsapparatur genommen und abgetupft wird, zurückbilden.

Eine Vacuolenbildung ist als Ursache wahrscheinlicher. Dabei gilt, daß bei Phalloidinintoxikation Invaginationen und Protrusionen (vgl. Schölmerich) morphologischer Ausdruck ein und desselben Grundphänomens unter veränderten Bedingungen sind.

Durch Interaktion von Phalloidin mit Aktin werden Stellen der Plasmamembran besonders anfällig gegen mechanische Einflüsse - und je nach den Umständen ausgebeult (in vitro) oder eingedrückt (in situ) (71). Es kommt durch den von der Blutbahn her wirkenden Druck zu einer Invagination zellfremder Kanäle und Seen in die Zelle, die mit deren ungestörter Funktion letztendlich nicht mehr zu vereinbaren sind.

Für eine direkte hormonelle Beeinflussung der RNA-Synthese ergeben sich aus der Literatur keine Anhaltspunkte. Zusammenhänge sind jedoch denkbar.

So sind die nach Verbrennungen am Ganztier beobachteten hohen Katecholaminausschüttungen der Grund für einen Hypermetabolismus, der die Energiereserven schwer angreift. Die hohen Katecholaminausschüttungen bewirken andererseits eine verstärkte Lipolyse, wobei die freien Fettsäuren durch CoA teilweise zu LCFACoA, Inhibitoren der Adeninnucleotidtranslocase, verestert werden. Diese wiederum katalysiert den Austausch des cytoplasmatischen ADP gegen das mitochondrial gebildete ATP (33,34,37,60) und hat damit direkten Einfluß auf sämtliche energieverbrauchenden Vorgänge im Cytoplasma.

Berücksichtigt man jetzt noch, daß 3 Tage nach Verbrennung eine Reduzierung des ACR der Mitochondrien auf 71 % gefunden wurde (4) und daß infolge der hohen Wärmeverluste an der Peripherie eine Kompensation der Verdunstungskälte im

Vordergrund steht, so wird ersichtlich, daß für energieverbrauchende anabole Reaktionen (z.B. RNA-Synthese) wenig Raum bleibt.

Welchem der geschilderten Effekte die hauptsächliche oder gar alleinige Rolle bei der RNA-Syntheseerniedrigung zufällt, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gesagt werden. Dies wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ist die Beherrschung der Schockphase nach Verbrennungen heute durchaus möglich, so ist das Problem der Spätmortalität noch immer ungelöst.

Bei der Suche nach den Ursachen wird der Intoxikation des Körpers mit körpereigenen Giften in letzter Zeit verstärkt Bedeutung zugemessen.

Verschiedene Gruppen berichteten von der Isolierung toxischer Substanzen nach Verbrennungen. Neben hochmolekularen (45) werden auch niedermolekulare Extrakte beschrieben. Allen ist gemein, daß sie vitale Stoffwechselprozesse entscheidend beeinflussen sollen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung niedermolekularer Fraktionen verbrannter Haut auf die RNA-Synthese der isoliert perfundierten Leber untersucht und mit Effekten verglichen, die an der Leber standardisiert verbrannter Tiere gefunden wurden.

Es ergab sich eine starke Hemmung der RNA-Synthese nach Zugabe des Dialysats. Selbst beim Einsatz von Mengen, die weit unter der von Schoenenberger (85) angegebenen Letaldosis liegen, wurde noch eine Senkung auf 42,5 % des Ausgangswertes gemessen. Als Erklärung für diese Veränderungen ist der Eingriff bestimmter Fraktionen des Dialysats in die Vorgänge der Genregulation, der Transkription (hier speziell Blockierung der RNA-Polymerase) und der ATP-Regeneration am ehesten denkbar.

Bei verbrannten Tieren war am 5. und 7. Tag nach Verbrennung die Syntheserate ebenfalls hochsignifikant auf 71,5 bzw. 74,5 % des Kontrollwertes erniedrigt. Ob dies einer toxischen Komponente aus der verbrannten Haut zuzuschreiben ist, bleibt unklar.

Aus dem Serum verbrannter Tiere konnte mit der gewählten

Methode keine ausreichende Menge Substrat mit toxischer Wirkung auf isolierte Hepatocyten gewonnen werden.

Unter Einbeziehung der übrigen Folgen einer Verbrennung wie Energiedefizit, eventuelle Infektion und hormonelle Verschiebungen, ist anzunehmen, daß toxische Substanzen aus der verbrannten Haut zusammen mit diesen Faktoren für die beobachteten Veränderungen des Leberstoffwechsels verantwortlich sind.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alexander, J.W., Stinnet, J.D., Ogle, C.K.: Alterations in neutrophil function. In: The immune consequences of thermal injury. Ed. John L. Ninnemann Ph.D.(1981)

2. Allgoewer, M., Städtler, K., Schoeneberger, G.A.: Burn sepsis and burn toxin. Annals of the Royal College of Surgeons of England. Vol. 55 (1974) 226-35

3. Altenburg, A. (persönliche Mitteilung) (1983)

4. Aprille, J.R., Hom, J.A., Rulfs, J.: Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. J. Trauma 17, 4 (1979) 279-88

5. Arturson, M.G.S., Wilmore, D.W.: World J. Surg. 2, 2 (1978) 203

6. Arturson, G., Johnsson, C.E.: Transcapillary transport after thermal injury. Scand. J. Plast Reconstr. Surg. 13, 1 (1979) 29-38

7. Baur, H.: Dipl.Arbeit Biochemie, Tübingen (1972)

8. Baur, H., Kasperek, S., Pfaff, E.: Criteria of viability of isolated liver cells. Hoppe.Seylers Z. Physiol. Chem. 356 (1975) 827-38

9. Baxter, C.R., Cook, W.A., Shires, G.T.: Serum myocardial depressant factor of burn shock. Surg. Forum 17 (1966) 1-2

10. Berry, M.N., Simpson, F.O.: Fine structure of cells isolated from adult mouse liver. J. Cell. Biol. 15 (1962) 9

11. Berry, M.N.: Metabolic properties of cells isolated from adult mouse liver. J. Cell. Biol. 15 (1962) 1-8

12. Berry, M.N., Friend, D.S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J. Cell. Biol. 43 (1969) 506

13. Berry, M.N., Friend, D.S.: Fine structure of liver parenchymal cells isolated by collagenase perfusion. J. Ultrastruct. Res. 30 (1970) 252

14. Berry, L.J.: Metabolic ellects of bacterial endotoxins. In: Microbial toxins, ed. Solomin, K., Weinbaum, G., Samuel, J.A., Academic Press N.Y. (1971) 165

15. Black, J.A., Harris, F., Miller, R.W.S.: Catecholamine excretion in burn in children. Burns 3,4 (1977) 218-24

16. Bruchelt, G.: Inauguraldissertation Tübingen (1980)

17. Budekke, E.: Grundriß der Biochemie, 6. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin (1980)

18. Burkhardt, H., Zellner, P.R.: Coagulation factors in human burn blisters. Blut 35,3 (1977) 241-46

19. Buselmaier, W., Biologie für Mediziner, 3. Aufl., Springer, Heidelberg (1976)

20. Castagna, M., Chauveau, J.: Séparation des hépatocytes isolés de rat en fractions cellulaires métaboliquément distinctes. Exp. Cell. Research 57 (1969) 211-22

21. Cueni, L.B., Allgoewer, M., Eppenberger, U., Städtler, K.E., Schoenenberger, G.A.: Physico-chemical characterization of a toxic lipoprotien produced by heat in mouse skin. Research in burns 471-74

22. Czihak, G., Langer, H., Zieger, H.: Biologie, 1. Aufl., Springer, Heidelberg (1976)

23. Dolecek, R., Mahuffey, W.: The uncoupling phenomenon and metabolic blocks after burns. Acta chir. plast. 12,4 (1970) 217-21

24. Dolecek, R., Adamkova, M., Sotornikova, T., Zavada, M., Kracmar, P.: Endocrine response after burn. Scand. J. Plast Reconst. Surg. 13 (1) (1979) 9-16

25. Fedorow, N.A.: Isolation and study of toxic fractions from burned skin. Vopr. Med. Khim. 20 (1974) 371-75

26. Frimmer, M.: Phalloidin, ein leberspezifisches Pilzgift. Biol. in unserer Zeit, 9. Jahrg. 5 (1979) 147-52

27. Hakim, A.A., Hawley, P.L., Rosenthal, S.R.: On the action of a purified "toxic factor" from scalded human skin. Fed. Proc.28 (1969) 712

28. Harder, F.: Zur Charakterisierung der Toxine aus verbrannter Mäusehaut. Zeitschr. ges. exp. Med. 145 (1969) 209-22

29. Herskowitz, I.H.: Principles of genetics second ed. Macmillan publishing Co., Inc., New York (1977)

30. Höcke, H.: Dipl.Arbeit Biochemie, Tübingen (1978)

31. Jefferson, L.S., Boyd, T.A., Flaim, K.E., Peava, D.E.: Regulation of protein synthesis in perfused preparations of rat heart, skeletal muscle and liver. Biochem. Soc. Trans. 8 (3) (1980) 282-83

32. Jezyk, P.F., Liberti, J.P.: Metabolic activities of mechanically and enzymatically prepared rat liver cells. Arch. Biochem. and Biophys. 134 (1969) 442-49

33. Jones, G.R.N.: The shocking consequences of defective ionic translocation in mitochondria. Med. Hypoth. 1 (1975) 118-27

34. Jones, G.R.N., Kramer, R.: Translocase inhibition in endotoxic shock: a late step in the sequence of lethal events. Biochem. Pharmacol. 27 (1978) 2931-37

35. Kalant, H., Miyata, R.: Metabolic alterations in tissues perfused with decalcifying agents. Biochem. J. 86 (1963) 336

36. Keppler, D.O.R., Pausch, J., Decker, K.: Selective uridine triphosphate deficiency induced by D-galactosamine in liver and reversed by pyrimidine nucleotide precursors. J. Biol. Chem. 249,1 (1974) 211-16

37. Klingenberg, M., Pfaff, E., in: Regulation of metabolic processes in mitochondria (ed.: Trager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E., Slater, E.C.) Elsevier, Amsterdam (1966) 180

38. Knippers, R.,: Molekulare Genetik, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart (1982)

39. Koslowski, L., Domres, B., Heller, W., Hettich, R., Schmidt, K., v. Kothen, W.: Neuere Entwicklungen in der Forschung und Behandlung von Verbrennungen. Med. Welt 28,38 (1977) 1495-504

40. Koslowski, L.: Kälte- und Wärmeschäden. In: Lehrbuch der Chirurgie, . Auflage, Schattauer-Verlag (1982)

41. Koslowski, L., Krause, F.: Kälte und Wärme. In: Klin. Pathophysiologie, 5. Aufl., hrsg. Siegenthaler, W., Thieme, Stuttgart (1982)

42. Kremer, B., Frenzel, H., Allgoewer, M., Städtler, K., Schoenenberger, G.A.: Transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen eines spezifischen Verbrennungstoxins und seine Auswirkung auf die Mäuseleber nach subletaler Verbrennung. Verh. Dtsch.. Ges. Path. 59 (1975) 581

43. Kremer, B., Schoelmerich, J., Allgoewer, M., Schmidt, K.H., Schweitzer, A., Schoenenberger, G.A.: Zur Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit. Helv. Chir. Acta 45, 1-2 (1978) 147-51

44. Kremer, B., Allgoewer, M., Scheidegger, A.M., Schmidt, K.H., Schoelmerich, J., Wuest, B., Schoenenberger, G.A.: Toxin-specific ultrastructural alterations of the mouse liver after burn injuries and the possibility of a specific antitoxic therapy. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 13 (1) (1979) 217-22

45. Kremer, B., Allgoewer, M., Graf, M., Schmidt, K.H., Schoelmerich, J.: The present status of research in burn toxins. Intensive Care Med. 7 (2) (1981) 77-87

46. Kröner, H., Meinken, E., Staib, W.: Adeninnucleotide und freie Aminosäuren in der Rattenleber sowie Aminosäure- und Corticosteronspiegel im Serum von Ratten nach Verbrennungen. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5 (1967) 81-83

47. Kröner, H., Beien, J., Staib, W.: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Protein- und Aminosäurestoffwechsel nach standardisierten Verbrennungen. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9 (1971) 314-19

48. Lemperle, G.: Research in burns, edited by P.Matter, T.L. Barclay, Z. Konickova, Hans Huber Publishers, Stuttgart (1971)

49. Liljedahl, S.O.: Special questions in connection with the energy supply in extensive burns. Langenbecks Arch. Chir. 347 (1978) 517-23

50. Loegering, D.J.: Circulating reticuloendothelial depressing substance following thermal injury and intestinal ischemia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166,4 (1981) 515-21

51. Loose, L.D., Turinsky, J.: Macrophage dysfunction after burn injury. Infect. Immun. 26,1 (1979) 157-62

52. Microbial Toxins, edites by K. Solomon, G. Weinbaum, J.A. Samuel, Academic Press, New York and London (1971)

53. Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L., Bale, W.F.: The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. J. Exp. Med. 94 (1951) 431-53

54. Moati, F., Moczar, E., Miskulin, M., Sepulchre, C., Robert, A.M., Monteil, R., Guilbaud, J.: Mise en évidence et caractérisation partielle de substances cardio-toxiques et neuro-toxiques dans le sérum de brulés. Path. Biol. 25,4 (1977) 225-32

55. Modjanova, E.A., Malenkov, A.G.: Alteration of properties of cell contacts during progression of hepatomas. Exp. Cell. Res. 76 (1973) 305-14

56. Monafo, W., Robinson, H., Yoshioka, T., Ayvazian, V.: Lethal burns. Arch. Surg., Vol. 113 (1978) 397-401

57. Mowschew, B.E.: Fractionation of proteins of normal and burned skin by the method of gel filtration. Patol. Fiziol. eksp. ter. 15 (1971) 37-41

58. Nedoshivina, R.V.: The effect of immunohemotherapy on the function of the reticuloendothelial system of the liver in severe burns. Pat. Fiziol. Eksp. Ter. 15, 3 (1971) 59-61

59. Ninnemann, J.L., Stein, M.D.: Bacterial endotoxin and the generation of suppressor T cells following thermal injury. J. Trauma 20,11 (1980) 959-66

60. Pfaff, E.: Dissertation Marburg (1965)

61. Rosenthal, S.R.: Neutralization of histamine and burn toxin. Ann. Surg. 106 (1937) 257-65

62. Rosenthal, S.R.: Substances released from the skin following thermal injury. "Burn Toxin" 46,5 (1959) 932-47

63. Rosenthal, S.R., Thadhani, K.C., Crouse, G., Spurrier, W.A.: Human "burntoxin" and in vitro produced antitoxin. Annals of N.Y. Acad. Sci. 15o (1968)

64. Rosenthal, S.R., Thadhani, K.C., Spurrier, W.A.: An inhibitor of toxinlethality: "Competitin". J. Exp. Med. Surg. 26 (1968) 124

65. Ross, B.D.: Perfusion Techniques in Biochemistry, Clarendon Press (1972)

66. Schimassek, H.: Perfusion of isolated rat liver with a semisynthetic medium and control of liver function. Life Sciences 11 (1962) 629-34

67. Schmidt, K.: In: Burn injuries (eds. L. Koslowski, K. Schmidt, R. Hettich) Schattauer, Stuttgart (1979)

68. Schmidt, K., Schölmerich, J., Kremer, B., Heller, W., Koslowski, L.: Studies on the structure and biological effects of pyrotoxins purified from burned skin. World J. Surg. 3 (1979) 361-365

69. Schmidt, K., Kistler, D., Bruchelt, G.: In: Die Verbrennungskrankheit (eds. Ahnenfeld, F.W., Bergemann, H., Burri, C., Dick, W., Halmagyi, M., Hettich, R., Hossli, G., Koslowski, L., Mehrkens, H.-H., Rügheimer, E.) Springer Verlag, Heidelberg (1982)

70. Schmidt, K.: Pathophysiologie der Verbrennung. Chir. Praxis 26 (1979/80) 19-24

71. Schoelmerich, J., Kremer, B., Schmidt, K., Schoenenberger, G.A., Hermawan, S.: Stoffwechsel und Morphologie der Rattenleber nach Hautverbrennung und Gabe eines "Verbrennungstoxins". Eine kombinierte Untersuchungsmethode. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83 (1978) 519

72. Schoelmerich, J., Schmidt, K., Kremer, B., Hagmeier, V., Mastari, H., Hermawan, S.: Leberstoffwechselveränderungen nach standardisierter Hautverbrennung und intraperitonealer Injektion eines aus verbrannter Mäusehaut isolierten Verbrennungstoxins. Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber. Chir. Forum Exp. Klin. Forsch. 140 (1979)

73. Schoelmerich, J., Kremer, B., Richter, I.E., Schmidt, K., Setyadharma, H., Schoenenberger, G.A.: Effect of cutaneous human or mouse burn toxin on the metabolic function of isolated liver cells. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 13 (1) (1979) 223

74. Schoelmerich. J., Kremer, B., Schmidt, K., Setyadharma, H., Richter, I.E., Schoenenberger, G.A.: Isolierte Rattenleberzellen unter dem Einfluß eines toxischen Faktors aus verbrannter menschlicher und tierischer Haut. Langenbecks Arch. Chir. 350 (3) (1980) 151-63

75. Schoelmerich, J., Kremer, B., Schmidt, K., Setyadharma, H., Schoenenberger, G.A.: Zur Energiestoffwechselstörung der Zelle bei der Verbrennungskrankheit. Untersuchungen an der Rattenleber. Acta Biol. Med. Ger. 39 (10) (1980) 1051-72

76. Schoenenberger, G.A.: Burn toxins isolated from mouse and human skin. Monogr. Allergy, Vol. 9 (1975) 72-139

77. Schoenenberger, G.A., Allgoewer, M., Kremer, B., Städtler, K.: Neue Gesichtspunkte zur Verbrennungskrankheit. Chirurg. 47 (1976) 582-88

78. Schreiber, G., Schreiber, M.: The preparation of single cell suspensions from liver and their use for the study of protein synthesis. Sub. Cell. Biol. Chem. 2 (1973) 321-83

79. Schröder, J.: Toxine von Diphtherie und Cholera. Biol. in unserer Zeit, 10. Jahrg. 1 (1980) 11-16

80. Seglen, P.O.: Preparation of rat liver cells. Exp. Cell. Res. 74 (1972) 450-54

81. Seglen, P.O.: Preparation of rat liver cells. Exp. Cell. Res. 76 (1973) 25-30

82. Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells. Meth. Cell. Biol. 13 (1976) 30-78

83. Seglen, P.O., Solheim, A.E.: Valine uptake and incorporation into protein in siolated rat hepatocytes. Eur. J. Biochem. 85 (1978) 15-25

84. Sepulchre, C., Moati, F., Miskulin, M.: Biochemical and pharmacological properties of a neurotoxic protein isolated from the blood serum of heavily burned patients. J. Pathol. 127,3 (1979) 137-45

85. Städtler, K., Allgoewer, M., Cueni, L.B., Schoenenberger, G.A.: Patholphysiologische Untersuchungen an einem Verbrennungsmodell der Maus. Res. exp. Med. 158 (1972) 23-33

86. Stieritz, D.D., Holder, I.A.: Experimental studies of the pathogenesis of infections due to Pseudomonas aeruginosa: description of a burned mouse model. J. infect. dis. 31,6 (1975) 688-92

87. Strickberger, M.W.: Genetics second ed. Macmillan Publishing Co., Inc. N.Y. (1976)

88. Struck, H.: Experimentelle Medizin. 1. Aufl., Thieme Stuttgart (1973)

89. Sugano, T., Suda, K., Shimada, M., Oshino, N.: Biochemical and Ultrastructural Evaluation of Isolated Rat Liver Systems Perfused with a Hemoglobin-Free Medium. J. Biochem. 83 (1978) 995-1007

90. Watson, J.D.: Molekularbiologie des Gens, 2. Ausgabe, Inter European Editions, Amsterdam (1975)

91. Worofka, R., Sauermann, G.: Kinetics of RNA-Synthesis and release in isolated rat liver nuclei. Biochem. et Biophys. Acta 518 (1978) 61-80

92. Wuest, B.: Inauguraldissertation, Basel (1977)

93. Zinck, K.H.: Path. Anatomie der Verbrennung, G. Fischer-Verlag, Jena (1940)

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. L. Koslowski, ärztlicher Direktor der Abteilung für allgemeine Chirurgie und Unfall-Chirurgie mit Poliklinik, für die Überlassung des Themas,

meinem Doktorvater, Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. K. Schmidt, für die Betreuung bei der Durchführung der Untersuchungen und der Abfassung der Arbeit,

Herrn Dr. D. Kistler und ganz besonders Herrn Dr. G. Bruchelt sowie allen Freunden für die stete Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Lebenslauf

Am 23.11.1958 wurde ich, Jürgen Sommerfeld, als Sohn der Eheleute Hans und Marga Sommerfeld, geb. Hofmann, in Ludwigsburg geboren.

In meinem Heimatort Benningen a/N besuchte ich von 1965 bis 1968 die Volksschule. Nach einem Jahr Realschule wechselte ich 1969 auf das Friedrich Schiller Gymnasium Ludwigsburg über.

Am 26.4.1978 erhielt ich dort das Zeugnis der Reife und konnte noch im selben Jahr das Studium der Zahnmedizin in Tübingen aufnehmen.

Nach erfolgreichem Abschluß der zahnärztlichen Vorprüfung im März 1981 begann ich im Sommer 1981 mit dem experimentellen Teil meiner Dissertation, den ich Ende 1982 abschloß.

In der Zwischenzeit hatte ich die Zulassung zum Humanmedizinstudium und die Erlaubnis zum Doppelstudium Medizin/ Zahnmedizin erhalten.

So war es möglich, daß ich nach erfolgreicher Beendigung des Staatsexamens in Zahnmedizin am 14.12.1983 im Studiengang Humanmedizin soweit fortgeschritten war, daß ich mich zur ärztlichen Vorprüfung im März 1984 melden konnte, um danach meine medizinische Ausbildung in der Klinik fortzusetzen.